

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2001-511881
(P2001-511881A)

(43)公表日 平成13年8月14日(2001.8.14)

(51)IntCl.⁷

識別記号

F I

ターコード^{*}(参考)

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 R

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21)出願番号 特願平9-505290
(86)(22)出願日 平成8年6月28日(1996.6.28)
(85)翻訳文提出日 平成9年12月26日(1997.12.26)
(86)国際出願番号 PCT/US96/11240
(87)国際公開番号 WO97/02487
(87)国際公開日 平成9年1月23日(1997.1.23)
(31)優先権主張番号 08/496, 939
(32)優先日 平成7年6月30日(1995.6.30)
(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ロシュ ダイアグノスティックス コーポ
レーション
アメリカ合衆国 46250 インディアナ州
インディアナポリス, ビー. オー. ボッ
クス 50528, ハーグ ロード 9115
(72)発明者 ブリッチャード, ジー., ジョン
アメリカ合衆国 01810 マサチューセッ
ツ州 アンドーバー, ワイルドローズ ド
ライブ 59
(72)発明者 ベイトソン, ジョセフ, イー.
アメリカ合衆国 46032 インディアナ州
カーメル, セネター ウェイ 14817
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 電気化学的バイオセンサ検査片

(57)【要約】

電気化学的バイオセンサ検査片(1)の血液サンプルの最小値は約9マイクロリットルである。検査片は作用電極(4)と対電極(5)を備えており、両電極はほぼ同じサイズであり、第1絶縁基板(2)上に配置された同じ導電材料からつくられている。両電極の上には第2絶縁基板(3)があり、この基板は試薬ウェルを形成する切欠き部分(8)を備えている。切欠き部分が両電極に面している面積は作用電極に対してより対電極に対しての方が小さい。分析物の分析のための試薬は試薬ウェル中の作用電極と対電極の露呈領域をほぼ覆っている。展開メッシュ(3)が試薬ウェル上に配置され第2絶縁基板に張り付けられている。展開メッシュ(3)は表面活性剤に浸されている。4ミリメートル対4.2ミリメートルの小さな切欠き部分、6ミリメートル対5.8ミリメートルの小さなメッシュ並びに乾燥前の4マイクロリットルの少量の試薬のおかげで本検査片は約9ミリリットルの全血サンプルが分析可能である。

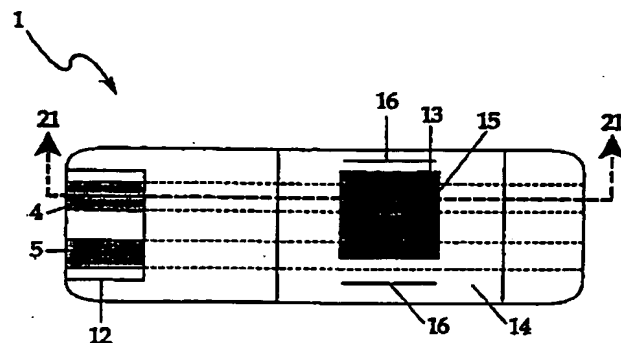


Fig. 3

【特許請求の範囲】

1. 分析物を検出または分析物の濃度を測定する装置であって、

第1電気絶縁体と、

ほぼ同じサイズの作用電極と対電極から成り、前記電極は同じ電気導材料で形成され前記第1電気絶縁体上に支持されている1対の電極と、

前記第1電気絶縁体及び前記電極の上に置かれ、前記作用電極より前記対電極の表面積を小さく露出する切り欠き部分を含む第2電気絶縁体と、

前記切り欠き部分内の露出電極表面をほぼ覆い、分析物を検出または濃度を測定する試薬と、

界面活性剤に浸され、前記切り欠き部分の上に置かれ、前記第2電気絶縁体に張り付けられている展開メッシュと、を含み、

前記切り欠き部分と展開メッシュは十分な大きさであり、前記試薬は、前記分析物を分析する約9マイクロリットルの最少量全血サンプルを受け入れるのに十分な量であることを特徴とする前記装置。

2. 前記展開メッシュは、1方の側が粘着面で、前記展開メッシュの少なくとも1部分と前記切り欠き部分に開かれている穴をもつテープにより第2の基板に張り付けられ、前記テープは前記穴の付近に少なくとも1つのスリットを含み、それによって少なくとも1つの通気孔をもたらし請求項1に記載の装置。

3. 前記作用電極および前記対電極と電気接続された電流測定器をさらに含む請求項1に記載の装置。

4. 前記テープの前記穴の両端にスリットを含み、それによって2つの通気孔をもたらし請求項2に記載の装置。

5. 前記切り欠き部分は4ミリメートル×4.2ミリメートルである請求項2に記載の装置。

6. 前記展開メッシュは6ミリメートル×5.8ミリメートルである請求項5に記載の装置。

7. 乾燥の前に試薬の量は4マイクロリットルである請求項6に記載の装置。

8. 前記展開メッシュはスルホコハク酸ジオクチルナトリウムに浸してある請

求項7に記載の装置。

9. 前記テープの前記穴は前記切欠き部分全体に開かれている請求項8に記載の装置。

10. 前記作用電極および前記対電極に電気接続されている電流測定器をさらに含む請求項9に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

発明の名称

電気化学的バイオセンサ検査片

関連出願の相互参照

本出願は、1994年2月21日出願の米国特許出願第08/198407の部分継続出願であり、その出願の開示は参照によって本出願に組み込まれている。

発明の分野

本発明は、全体的には流体内の分析物の濃度の判定に関し、具体的にはこうした判定で使用される電流測定式バイオセンサに関する。

発明の背景

バイオセンサは新しいものではない。流体中の様々な分析物の濃度の判定におけるバイオセンサの使用も周知である。

1986年12月31に発行のNankaiその他によるW086/07632には、電流測定式バイオセンサシステムが開示されている。このシステムでは、グルコースを含む流体がグルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムに接触している。グルコースは酸化され、フェリシアン化物がフェロシアニドに還元される。（この反応はグルコースオキシダーゼを触媒として引き起こされる。）2分後には、電位が印加されて、フェリシアン化物をフェロシアニドに再酸化することで発生する電流が得られる。電位が印加された後で2秒後に得られた電流値は、流体中のグルコースの濃度と相関している。

Nankaiその他の発明には、グルコースとフェリシアン化物の反応が電位の印加の前に完了する方法を開示しているので、この方法は、電流測定式決定の「終点」方法と呼ばれている。

Nankaiその他によるシステムでは、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムが不織のナイロンメッシュに含まれている。このメッシュは、作用電極と、対電極と、基準電極とに接触するように配置されている。

対電極と基準電極の総面積は作用電極の総面積の2倍になっている。

1986年12月30に発行されたWogomanのEP0 206218には、2つの電極を備えたバイオセンサが開示されている。両電極とも異なる電導材料から形成されている。たとえば、アノードは、プラチナなどのアノード材料から形成され、カソードは銀などのカソード材料から形成されている。アノードは酵素で覆われている。好ましい実施例では、被覆電極は、グルコースに浸透性のあるエラストマーで覆われている。

1989年9月21日公告のPottgenその他によるW089/08713には、2電極式のバイオセンサの使用が開示されている。両電極とも同じ貴金属からつくられているが、一方は（偽基準電極と呼ぶ）が他の（作用）電極より大きくなっている。

近年では、1994年2月22日に発行されたPollmannその他による米国特許第5288636号には、ほぼ同じサイズに形成され、同じ電導材料から形成されている作用電極と対電極を備えた電気化学的バイオセンサ検査片が開示されている。Pollmannその他による検査片には、約10ないし70マイクロリットルの人間の全血の検査サンプルを保持する試薬ウエルが備えられている。しかし、約13マイクロリットルより少ないと、全血サンプルからグルコースなどの試薬の測定にエラー（サンプル容量低投与エラー）が発生することになる。一般に、サンプル容量低投与エラーでは、分析物の控えめな測定として現れたり、検査片に接続されて使用されたメータにより分析物が測定できなくなる。サンプル容量低投与エラーは、ランセットで指をつくことで検査用にふさわしい量の血滴を汲み出すことが難しいことが多い幼児や老人に特に懸念される。

したがって、血液中のグルコースなど分析物の検査に必要な血液量を最小にする検査片を設計するのが極めて望ましい。

発明の要約

本発明は、同様の構成の従来の検査片より必要な血液サンプルの最小容量が小さい電気化学的バイオセンサ検査片である。本発明の検査片は、同様の構成の従来の検査片より試薬ウエルが小さく、展開メッシュ（spreading mesh）が小さい。さらに、試薬ウエルが同様の構成の従来の検査片とは異なって位置づけられている。

る。この新しい片に必要な血液の容量サンプルは最小約9マイクロリットルである。

サンプル容量の必要量が小さくなることは、全血サンプルからグルコースなどの分析物を測定するときにサンプル容量低投与エラーが少なくなることを意味している。これは、ランセットで指をついて適切な血滴をしぼりだすのが難しい幼児や老人といった人々には特に重要である。さらに、本発明の検査片を用いると、複数の電流測定値を集めてこうした測定値をサンプルからの分析物の濃度に相関させる測定器が、サンプル容量低投与エラーを識別するのが容易になる。さらに、バイオセンサ片当たりの試薬ウエルに必要となる試薬が少なくなるので、バイオセンサ検査片の大量生産用の生産量が増えることになる。

さらに、展開メッシュが粘着テープにより検査片に貼ってあると、そのテープには試薬ウエルと展開メッシュに開いている穴を備え、さらに穴の両対抗側部には複数の通気孔を備えている。こうした通気孔は、サンプルが検査中に試薬ウエルに捕えられた気泡の発生を抑える。気泡は検査エラーにつながる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のバイオセンサ検査片の分解図である。

図2は、試薬、展開メッシュ、通気孔を備えた粘着テープを除外したバイオセンサ検査片の上面図である。

図3は、完全に組み立てられた好ましいバイオセンサ検査片の上面図である。

図4は、線21-21に沿った図3のバイオセンサの断面図である。

図5は、多数の様々なバイオセンサ検査片の仮定校正曲線を示す。

好ましい実施例の説明

本発明のバイオセンサ検査片は、1994年2月22日に発行のPollmannその他による米国特許第5288636号に記載の検査片の好ましい実施例と同じであり、前記特許の開示は参照によって本明細書に組み込まれている。しかし、Pollmannその他による検査片は、約13マイクロリットル未満の全血サンプルが血液中のグルコースを検査するのに使用されるときに余りに多くの低投与エラー

が発生するような構成を有する。

本発明の検査片では、試薬ウエル9（図4）が、Pollmannその他による試薬ウエルより小さく、切欠き部分8により露呈している表面積は、作用電極4より対電極5の方が小さくなるように配置されている。この切欠き部分8は試薬ウエル9を形成する（図1ないし図4）。展開メッシュであるメッシュ13もPollmannその他によるメッシュより小さい（図1、3、4）。検査片の構成のこうした変更の結果、約9マイクロリットルの最小量全血サンプルからグルコースなどの分析物を正確に測定可能になる。

図1ないし図4を特に参照すると、本発明のバイオセンサ検査片の好ましい実施例が示されている。

検査片1は、第1および第2電気絶縁層2、3から成る。どのような有益な絶縁材料も適用可能である。通常は、ビニルポリマーやビニルポリイミドなどのプラスチックが、望ましい電気特性および構造特性を提供する。こうした層はMelinex 329, 7milが好ましい。

図1ないし図4に示すバイオセンサ検査片は、ロール材料から大量生産されるよう意図されており、ロール処理のために十分に柔軟で、同時に、最終的なバイオセンサ検査片が使用できるほど堅い材料を選択する必要がある。

層2と3の厚さは使用可能であれば任意である。好ましい実施例では、層2と3の厚みは約7ミルである。

作用電極4と対電極5は、ポリイミドなど絶縁材料7の裏当て上に配置して、層2に貼られる前に電極が破れる可能性を低減するのが好ましい。作用電極4と対電極5はほぼ同じサイズであり、同じ電導材料でつくられる。使用可能な電導材料の例はパラジウム、プラチナ、金、銀、炭素、チタンおよび銅である。貴金属が好ましいのは、一定で再現可能な電極面積となるからである。パラジウムは、中でも耐酸化貴金属であり比較的安価であるために特に好ましい。銀は上記の他の貴金属より空気により酸化しやすいので好ましくはない。好ましくは、電極4と5の厚みは約0.1ミクロンであり、裏当て部7の厚みは約25ミクロンである（カリフォルニアのCourtaulds Performance FilmsやSouthwall Technologies, Inc.のものが市販されている）。

電極 4 と 5 は、1 方の電極の電気化学的事象が他の電極の電気化学的事象に抵触しないように十分に分離しなければならない。電極 4 と 5 の間の好ましい距離は約 1. 2 ミリメートルである。

好ましい実施例では、電極 4 と 5 は、裏当て 7 に張り付けられており、リールからほどかれて、ホットメルト接着剤（図示せず）により層 2 に接着される。電極 4 と 5 は、層 2 の一端から他端に並列に延在するのが好ましい。

絶縁層 3 は層 2 の頂部と電極 4 と 5 にホットメルト接着剤（図示せず）により固定されている。層 3 は、切欠き部分 8 を含み、この部分 8 は試薬ウエル 9 を画定する。切欠き部分 8 のサイズと位置は、本発明には重要である。切欠き部分 8 は十分に小さくなくてはならず、展開メッシュと組み合わせて、以下に説明するように、約 9 マイクロリットルの最小全血サンプル量が検査片により正確に分析できるように配置する必要がある。切欠き部分 8 の好ましいサイズは $4 \times 4. 2$ ミリメートルである。

好ましい実施例では、切欠き部分 8 の 4 mm 側部は図 1 ないし図 4 に示す検査片の長手側部に並列である。重要なことは、露呈表面積が作用電極 4 より対電極 5 のほうが小さくなるように電極 4 と 5 上に切欠き部分 8 を配置することである。作用電極 4 の露呈表面積は、対電極 5 の露呈表面積の 2 倍なのが好ましい。驚くべきことに、作用電極より対電極に対するほうが露呈表面積が小さくなるように切欠き部分 8 をずらしても、測定サンプルからの分析物の測定に悪影響を及ぼすことはない。好ましい実施例では、電極 4 と 5 の幅は 1. 5 mm である。

バイオセンサ検査片 1 には、作用電極と対電極に電気的に接続された電源（図示せず）、および同様に作用電極と対電極に電気接続された電流測定計（図示せず）が付随している。

バイオセンサ試薬 1 1（図 4）は、作用電極 4 と対電極 5 の露呈表面 1 0 と 2 0 すべてをほぼ覆うようにウエル 9 に入れてある（図 2 ないし図 4）。本発明のバイオセンサ検査片で利用できる試薬の例としては、全血サンプルからグルコースを測定する試薬が挙げられる。

酸化還元メディエータの酸化形状として酵素グルコースオキシダーゼとフェリシアナイドを使用してグルコース試薬をつくる過程は以下の通りである。

工程 1 - pH 6.25 で 1.2000 グラム (g) の NATROSOL-250M を 0.740M の水性リン酸水素二カリウム緩衝剤 (80.062g のリン酸二水素カリウムと 26.423g のリン酸二水素カリウムを含む) を加えることで 1 リットルの緩衝剤 / NATROSOL 混合物を (容量フラスコに) 準備する。NATROSOL を 3 時間攪拌し膨張 (swell) させる。

工程 2 - 14.0000g の AVICEL RC-591F と 504.7750g の水を 20 分間混合することで AVICEL 混合物を準備する。

工程 3 - 514.6000g の緩衝剤 / NATROSOL 混合物に 0.5000g の TRITON X-100 を加えて TRITON 混合物を準備して、15 分間攪拌する。

工程 4 - 攪拌中に、ファンネルまたはピュレットで総 AVICEL 混合物に総 TRITON 混合物を滴下して添加する。添加が完了すると、1 晩攪拌を続ける。

工程 5 - 工程 4 からつくられた混合物に、攪拌しながら、98.7750g のフェリシアン化カリウムを加える。(加えられたフェリシアン化カリウムが溶解するように 1 度に少量のフェリシアン化カリウムを加える。)

工程 6 - 工程 5 からつくられた混合物を 20 分間攪拌する。

工程 7 - 水酸化カリウムを加えることで工程 6 からつくられた混合物の pH を 6.25 に調整する。

工程 8 - 工程 7 からつくられた混合物に、9.1533g のグルコースオキシダーゼ (Biozyme による 1 ミリグラム (mg) 当たり 218.50 テトラメチルベンジジン単位) を加えて、少なくとも 20 分間攪拌する。

工程 9 - 工程 8 からつくられた混合物に、20g のグルタミン酸カリウムを加えて、少なくとも 20 分間攪拌する。

工程 10 - 100 ミクロンのふるいバッグを通してろ過して、AVICEL のクランピング (凝集) を取り除く。ろ液は、試薬混合物 (試薬 11) となる。この試薬は試薬ウエル 9 に加えられ、約 50℃ で約 3 分間乾燥させる。

グルコースの判定の好ましい実施例では、上記のプロトコルによりつくられた 4 マイクロリットルの試薬が、切欠き 8 により形成されたウエル 9 に加えられる。

この量の試薬 11 は電極 4 と 5 の表面 10 と 20 (図 2) をほぼ覆い、十分な量

のフェリシアン化物と酵素（グルコースオキシダーゼ）も含むことになり、（人間の全血のサンプルから）グルコースの酸化に触媒作用を引き起こし、約20分以内に、ここで定義されているように、フェリシアン化物を完全に還元することになる。（試薬をウエル9に加える前に、1分毎に4メートルで移動する処理ライン上に1/40,000インチの間隙を空けた600ワットのコロナアークでウエル9を処理し、ウエル9を親水性にして、試薬をウエルに一層均等に拡げるのが好ましい。）

調剤された他のグルコース試薬には、300ミリモルのフェリシアン化カリウムと、250ミリモルのリン酸カリウム緩衝剤と、試薬1リットル当たり14グラムの微結晶セルロース（AVICEL RC-591F）と、0.6グラムのヒドロキシエチルセルロース（NATROSOL-250M）と、試薬1リットル当たり0.5グラムのトリトンX-100界面活性剤と、37ミリモルのコハク酸ナトリウムと、試薬1リットル当たりグルコースオキシダーゼの1.57万個のテトラメチルベンジジン単位とが含まれる。水酸化ナトリウム（6規定液）が、この試薬を6.6のpHに滴定するのに使用される。この試薬は上記の同じプロトコルで処方できるが、構成成分の量を調整し、置換して（コハク酸ナトリウムの代わりにグルタミン酸カリウムを、水酸化ナトリウムの代わりに水酸化カリウムを）、上記の構成要素の濃度を達成する。試薬ウエル9でこの試薬を乾燥すると典型的には、酵素活性が約30ないし35%失われる。

試薬11を乾燥させた後、界面活性剤が浸された展開メッシュ13を切欠き部分8上に配置して、第2の電気絶縁部3に貼る。展開メッシュ13は、ZBF（Zurich Bolting Cloth Mfg. Co. Ltd., Ruschlikon, Switzerland）のポリエステルのモノフィラメントメッシュが好ましい。展開メッシュは、メタノール対水が50対50（容量対容量）の溶液に0.8%（重量対容量）のスルホコハク酸ジオクチルナトリウムを加えた溶液に浸し、その後乾燥させるのが好ましい。展開メッシュ13は、切欠き部分8のサイズと切欠き部分8の配置を組み合わせ、バイオセンサ片は約9マイクロリットルの全血サンプルの最小値から分析物を正確に分析できるほど小さくしなければならない。展開メッシュ13の好ましい寸法は6 m

m×5.8mmである。最も好ましいバイオセンサ片は、メッシュの6mm辺が図1ないし図4に示す片の長辺に平行である。

展開メッシュ13を穴15を備えた粘着テープ14に張り付けるのが好ましい(図1、3、4)。粘着テープ14は、粘着裏当てを有するポリエステルからつくられるのが好ましい。(Tapemark, Medical Products Division, 223E. Marie Ave., St. Paul, Minnesota 55118から入手可能)粘着テープはダイドマルーン(dyedma room)が好ましく、穴15にはバイオセンサにより分析されるサンプルを適用するためのターゲット領域が備えてある。穴15は少なくとも展開メッシュ13の一部と切欠き部分8を露出させ、切欠き部8のほぼ全体を露出させるのが好ましい。テープ14には、穴15の両端に配置された、図1と図3に示してあるようなスリット16が備えてあるのが好ましい。(2つのスリット16が図1と図3に示してあるが、1つのスリットで十分である。)スリット16は通気孔を構成している。この通気孔は、全血のサンプルを試薬ウエルに加えたときに試薬ウエルに捕えられた気泡の発生を減少させる。試薬ウエル9に捕えられた気泡の発生を減少させると、検査エラーが減る。

試薬を乾かして展開メッシュを貼った後、複数のロール形状のバイオセンサを打抜きにより分離して、離散バイオセンサを形成する。こうしたバイオセンサは、1)作用電極と対電極と電氣的に接続され、作用電極の表面にレドックスメディエータの還元形の拡散限界電気酸化を引き起こすのに十分なだけの、作用電極と対電極間の電位差を供給可能な電源と、2)作用電極と対電極に電氣的に接続され、上記に電位差が加えられるとレドックスメディエータの還元形の酸化によりもたらされた拡散限界電流を測定可能な測定器と、に接続して使用される。

上記の測定器は通常、アルゴリズム(以下に記載)を電流測定に適用するように適合される。電流測定では、分析物濃度が示され表示される。こうした電源、測定器およびバイオセンサシステムの改良は、すべて譲渡済みの1990年10月16日発行の米国特許第4963814号、1991年3月12日発行の米国特許第4999632号、1991年3月12日発行の米国特許第4999582号、1993年9月7日発行の米国特許第5243516号、1994年10月4日発行の米国特許第5352351号、1994年11月22日発行の米国

特許第5366609号、1993年6月8日（1994年12月27日特許証発行料郵送）出願のWhiteその他による米国特許出願第08/073179号、1994年11月22日（1995年5月5日特許書発行料郵送）出願のWhiteその他による米国特許出願第08/343363号の主題である。これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれている。

電源と測定器の電気接続を容易にするために、作用電極と対電極を露出する追加欠き部分12（図1ないし図4）を、バイオセンサ装置に備えるのが好ましい。

上記のバイオセンサ装置は、以下の工程を実行することで流体サンプルの分析物の濃度を判定するのに使用できる。

a) 全血など流体サンプルを、作用電極4と対電極5の表面10と20をほぼ覆う（上記の）試薬に接触させる。

b) ここで定義されたように、分析物とレドックスメディエータの酸化形の間の反応を完了させる。

c) その後、作用電極の表面にレドックスメディエータの還元形状の拡散限界電気酸化を引き起こすのに十分な電極間の電位差を加える。

d) その後、発生した拡散制限電流を測定する。

e) 電流測定と流体の分析物の濃度を相関させる。（反応の完了は、作用電極の表面で分析物の濃度とレドックスメディエータの還元形の酸化により生成された拡散限界電流を相関させるのに十分な分析物とレドックスメディエータの還元形間の反応として定義される。）

多くの分析物含有流体が分析できる。たとえば、全血、血清、尿、髄液などの人体の流体中の分析物を測定できる。さらに、発酵製品や、潜在的に環境汚染物を含んでいる環境物質の分析物も測定できる。

人体の流体、特に全血中の分析物を測定するときに、電極間に加えられた電位差は約500ミリボルトより大きくないことが好ましい。約500ミリボルト以上の電位差が電極間に加えられると、（パラジウムの）作用電極面といくつかの血液構成要素の酸化が過度になるので、分析物の濃度と電流の正確な相関を妨げることになる。全血サンプルのグルコースの分析では、レドックスメディエータ

の酸化形はフェリシアン化物で、約150ミリボルトから約500ミリボルトの電位差が電極間に加えられ、作用電極の表面でレドックスメディエータの還元形の拡散限界電気酸化を達成する。約300ミリボルトの電位差を電極間に加えるのが好ましい。

レドックスメディエータの還元形の酸化により生成された電流は、電位差が電極間に加えられた後で約0.5秒から約30秒の任意の時点で測定される。約0.5秒より短いと、拡散限界電流は、充電電流のため測定するのが難しい。約30秒後では、対流が大きくなるので、拡散限界電流の測定が妨害される。

流体サンプルの分析物の分析中に測定された電流を、電流測定器によるアルゴリズムの適用によりサンプル中の分析物の濃度に相関させる。このアルゴリズムは、以下の例で示してあるように単純なものである。

$$[\text{分析物}] = C i_{7.5} + d$$

ただし、[分析物]はサンプル中の分析物の濃度を表し（図5参照）、 $i_{7.5}$ は電極間に加えられた電位差を加えた後7.5秒後に測定された電流（マイクロアンペア）であり、Cは線22の傾斜（図5）であり、dは軸の切片（図5）である。

分析物の周知の濃度で測定することで、校正曲線22（図5）が作られる。この校正は測定器の読取り専用メモリ（ROM）キーに記憶されており、バイオセンサ試験片の特定のロットに適用することができる。図5の線24と26は、バイオセンサ試験片の他の異なる2つのロットに対する他の仮定的な校正曲線を表す。こうしたバイオセンサのロットに対する校正により、上記のアルゴリズムにおけるCとdのやや異なる値が生成される。

人体の全血のサンプルのグルコースを分析するときに、20マイクロリットルの全血を上記のグルコース試薬に加えるのが好ましい。グルコースとフェリシアン化物の反応が完全に行われ、グルコン酸とフェリシアン化物が形成される。この反応は完了するのに短い時間、好ましくは約20秒未満しか必要としない。全血サンプルを加えた後約20秒で、約300ミリボルトの電位差が電極間に加え

られ、作用電極の表面でフェロシアニドはフェリシアン化物に酸化される。電流

測定は、電位差が電極間に加えられた後で1秒から7.5秒間の0.5秒間隔で行われる。こうした電流測定は血液サンプル中のグルコースの濃度と相関付けられる。

血液サンプルのグルコースを測定する例では、電流測定は、(上記のように)単一の固定時間ではなく(電位差が加えられた後1秒から7.5秒の間の)様々な時間で行われ、その結果のアルゴリズムはより複雑になり、以下の方程式で表すことができる。

$$[\text{グルコース}] = C_1 i_1 + C_2 i_2 + C_3 i_3 + \dots + C_n i_n + d$$

ここで、 i_1 は第1測定時(300ミリボルトの電位差を加えた後1秒後)に測定された電流であり、 i_2 は第2測定時(300ミリボルトの電位差を加えた後1.5秒後)に測定された電流で、 i_3 は第3測定時(300ミリボルトの電位差を加えた後2秒後)に測定された電流で、 i_n は第n測定時(本例では、300ミリボルトの電位差を加えた後14番目の測定時または7.5秒)に測定された電流で、 C_1 、 C_2 、 C_3 および C_n はPrinciple Components AnalysisまたはPartial Least Squaresなどの多変量回帰分析技術から誘導された係数であり、 d は(グルコース濃度単位の)回帰切片である。(この処理過程の修正は、図5に示す較正曲線が大きな曲率を有する場合に使用される。)

代わりに、測定中のサンプルのグルコースの濃度は、ある時間間隔で(たとえば、300ミリボルトの電位差を加えた後1秒から7.5秒)電流*i*対測定時間の曲線を積分することで測定でき、測定期間中に転送された全電荷が得られる。転送された全電荷は、測定中のサンプル中のグルコースの濃度に正比例する。

さらに、グルコース濃度の測定は、実際の測定時の環境温度と較正時の環境温度間の差に応じて訂正される。たとえば、グルコースの測定用の較正曲線が23℃の環境温度で較正された場合には、グルコース測定は以下の方程式により訂正される。

$$[\text{グルコース}] \text{ 訂正} = [\text{グルコース}] \text{ 測定} \times (1 - K (T - 23^\circ\text{C}))$$

ただし、 T はサンプル測定時の環境温度(℃)で、 K は以下の回帰方程式から誘導された定数である。

$$Y = K (T - 23)$$

ただし $Y = ([\text{グルコース}]_{23^\circ\text{C}} \text{での測定} - [\text{グルコース}]_{T^\circ\text{C}} \text{での測定}) / [\text{グルコース}]_{T^\circ\text{C}} \text{での測定}$

K の値を計算するためには、様々なグルコース濃度のそれぞれを様々な温度 T と 23℃（基本）で測定器により測定される。次に、T - 23 の Y の線形回帰が実行される。K の値はこの回帰の傾斜である。

サンプルのグルコース濃度は、本発明のバイオセンサを利用する本発明の方法により正確に測定される。さらに、人の全血のサンプルを測定するときには、ヘマトクリット効果によるエラーは 30 ないし 55 % のヘマトクリットの範囲では重要ではない。

本発明により特性の分析物を測定するときに使用できる酵素とレドックスメディエータ（還元形）の他の例が以下の表 1 に示してある。

表1

分析物	酵素	レドックスメディエータ (酸化形)	追加メディエータ
グルコース	グルコースデヒドロゲナーゼ及びジアホラーゼ	フェリシアン化物	
グルコース	グルコースデヒドロゲナーゼ (キノンプロテイン)	フェリシアン化物	
コレステロール	コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼ	フェリシアン化物	2,6-ディメチル-1,4-ベンゾキノン 2,5-ジクロロ-1,4-ベンゾキノン またはフェナジンエソスルファエート
HDL コレステロール	コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼ	フェリシアン化物	2,6-ディメチル-1,4-ベンゾキノン 2,5-ジクロロ-1,4-ベンゾキノン またはフェナジンエソ硫酸
トリグリセリド	リボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、及びグリセロール-3-フォスフェートオキシダーゼ	フェリシアン化物またはフェナジンエソ硫酸	フェナジンメソ硫酸
乳酸塩	乳酸オキシダーゼ	フェリシアン化物	2,6-ジクロロ-ベンゾキノン
乳酸塩	乳酸デヒドロゲナーゼ及びジアホラーゼ	フェリシアン化物、エソ硫酸フェナジンまたはメソ硫酸フェナジン	
乳酸デヒドロゲナーゼ	ジアホラーゼ	フェリシアン化物、エソ硫酸フェナジンまたはメソ硫酸フェナジン	
ビリルビン酸塩	ビリルビン酸オキシダーゼ	フェリシアン化物	
アルコール	アルコールオキシダーゼ	フェニレンジアミン	
ビリルビン	ビリルビンオキシダーゼ	1-メトキシ-メソ硫酸フェナジン	
尿酸	ウリカーゼ	フェリシアン化物	

表1に示した例には、少なくとも1つの追加酵素が反応触媒として使用されているものもある。さらに、表1に示す例のいくつかは、追加メディエータを利用することもできる。この追加メディエータは、レドックスメディエータの酸化形への電子の転送を容易にする。追加メディエータは、レドックスメディエータの酸化形よりも少量の試薬に付与される。

Pollmannその他の特許に開示されている本発明に最も近い従来のバイオセンサ検査片の好ましい実施例と比較すると、本発明のバイオセンサには以下の顕著な特色がある。

1. 試薬ウエル9が30%小さい。
2. 作用電極と対電極がほぼ同じサイズであると、試薬ウエルの対電極の露出表面積は試薬ウエルの作用電極の露出表面積より小さい。
3. 試薬ウエルに必要な試薬の量が少ない（Pollmannその他の好適実施例の6マイクロリットルに対して4マイクロリットルの試薬）。
4. 必要な展開メッシュが小さい。
5. 試薬ウエルの両対抗端部に複数の通気孔を備える。

検査片に投与するのに必要なサンプル量が少なくなることは、不十分な投与によるエラーが少なくなることになる。この結果は、ランセットにより指を刺して適切な量の血滴をとるのが難しい幼児や高齢者のような人にはとくに意義深い。本発明の検査片では、電流測定器がサンプル量が不十分なことによるエラーを識別するのが一層容易になる。さらに、センサ当たりの試薬の量が少なくなると、大量生産によるセンサの生産量が増大する。その上、試薬ウエル付近に側部通気孔を備えてあるので、試薬ウエルに捕えられる気泡が減少する。

上記の教示および図面に本発明は十分に明せきかつ簡潔に開示されてきたので、当業者が本発明をつくって使用し、本発明を実行する最良の方式を知り、他の発明や以前の発明と本発明を識別できる。多くの発明や本発明の多くの適用製品を容易に思い付くであろうが、これらは本明細書に請求されている発明の範囲に含まれている。

【 図 1 】

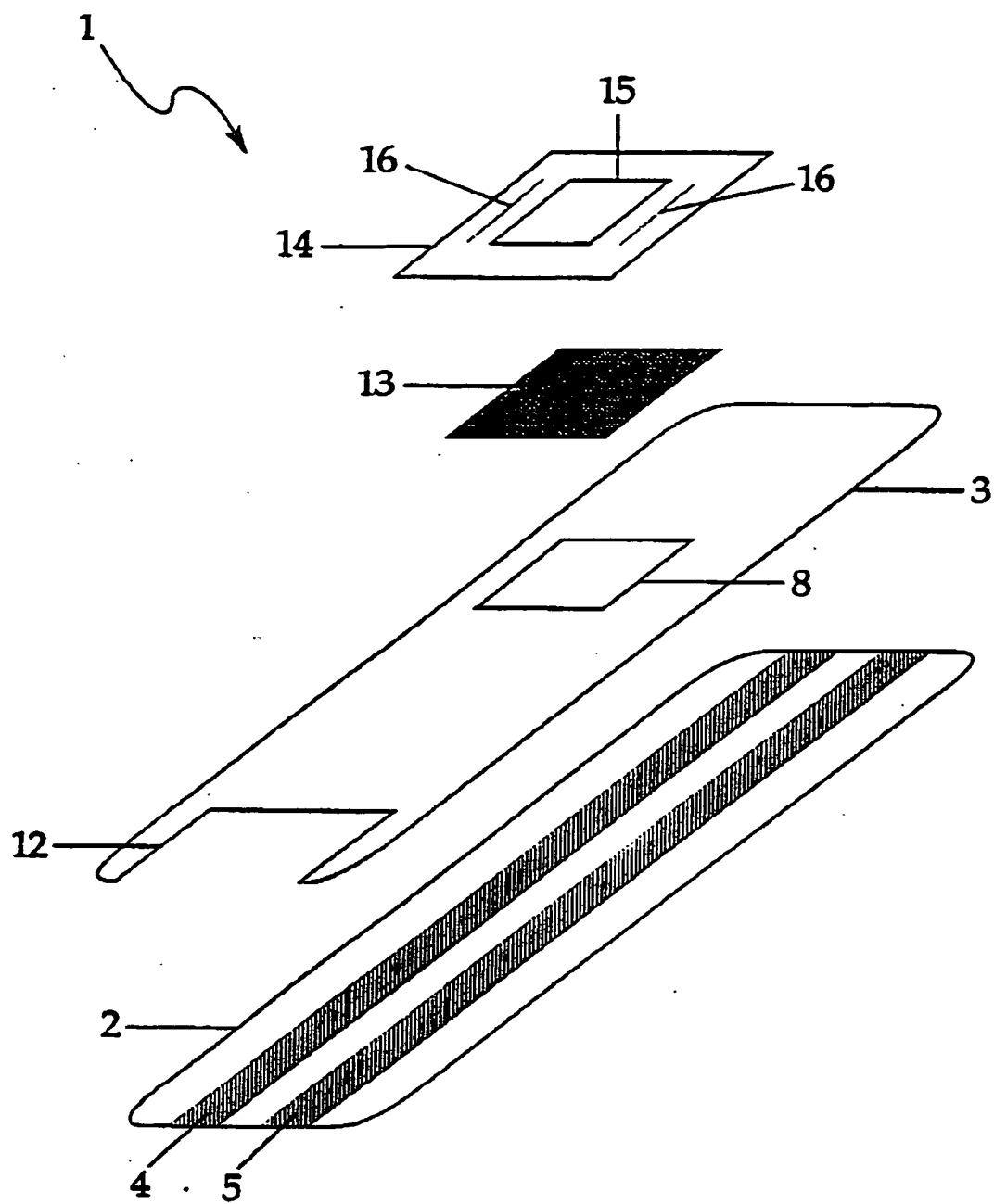


Fig. 1

【 図 2 】

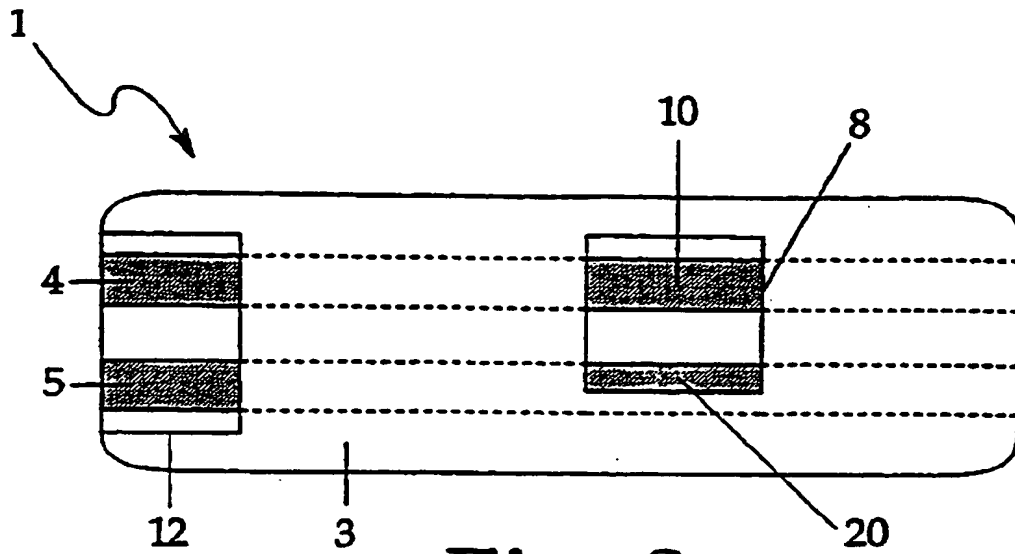


Fig. 2

【 図 3 】

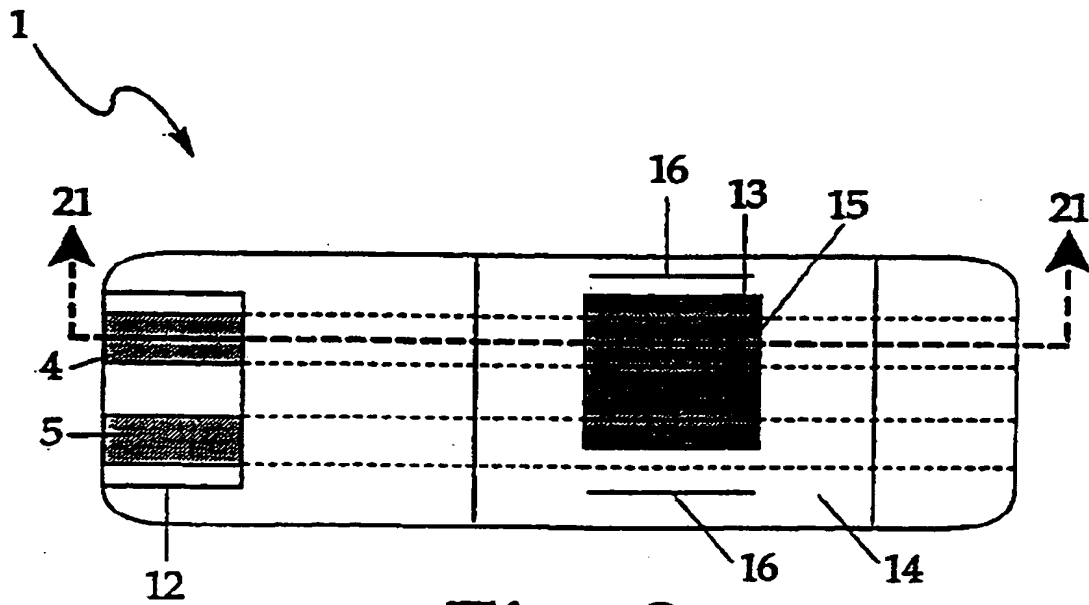


Fig. 3

【 図 4 】

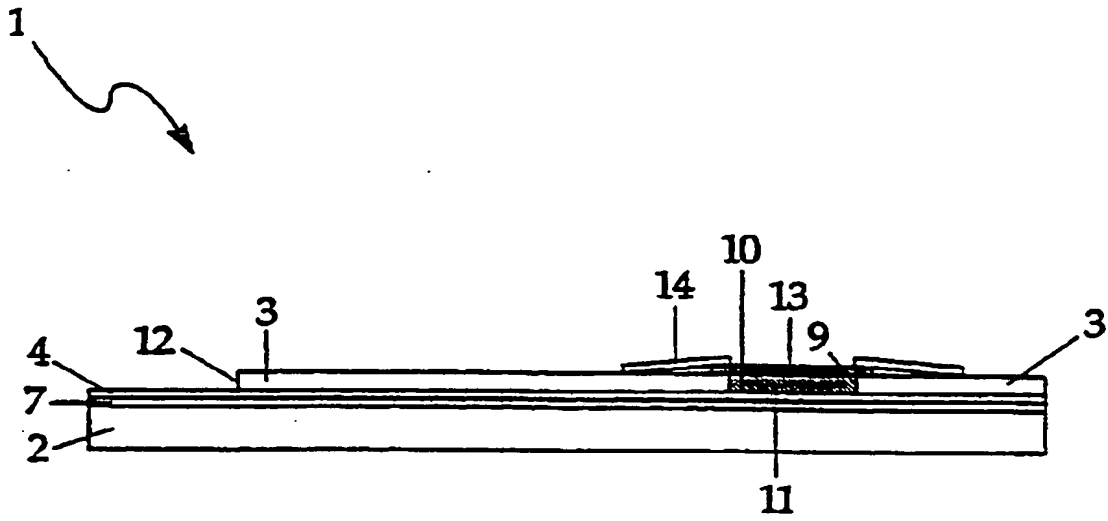


Fig. 4

【 図 5 】

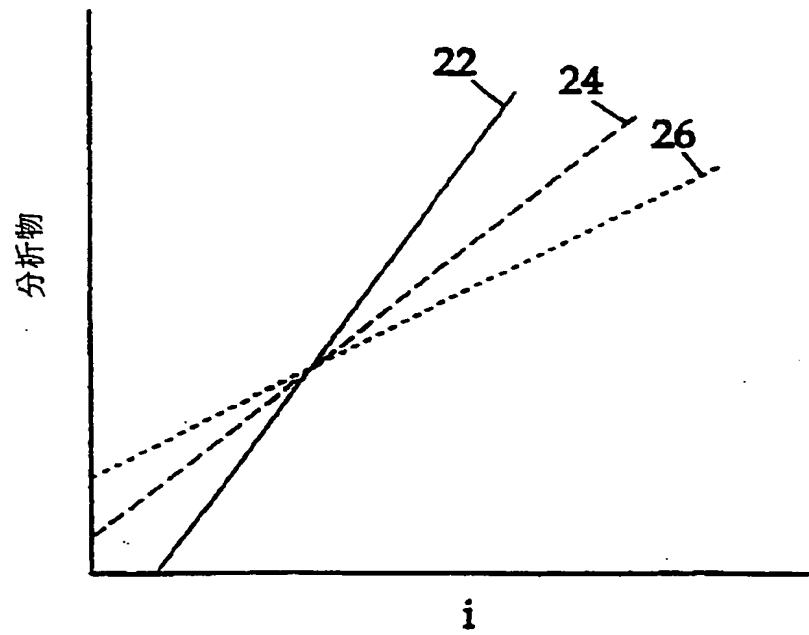


Fig. 5

[国际调查报告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/11240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) : G01N 27/327

US CL : 204/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 204/403, 416, 418, 449; 435/817

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,842,712 (Seshimoto et al), 27 June 1989, see column 3, line 30.	2,4-10
Y	US, A, 4,897,173 (Nankai et al), 30 January 1990, see column 3, lines 26-64.	1-10
Y	US, A, 5,288,636 (Pollmann et al), 22 February 1994, see column 9, line 43.	1-10
Y	US, A, 5,385,846 (Kuhn et al) 31 January 1995, see column 2, line 61 to column 3, line 50.	1-10
Y	US, A, 5,395,504 (Saurer et al), 07 March 1995, see column 6, line 61 to column 7, line 16.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"a" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

20 SEPTEMBER 1996

Date of mailing of the international search report

27 NOV 1996

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

T. TUNG

Telephone No. (703) 308-3329

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 ヒル, ブライアン, エス.

アメリカ合衆国 46268 インディアナ州
インディアナポリス, サン フェルナン
ド ドライブ 4710, アパートメント シ
ー

(72)発明者 ヒールド, ブライアン, エイ.

アメリカ合衆国 46038 インディアナ州
フィシャーズ, シーグレーブ ドライブ
10337

(72)発明者 フッバード, スコット, イー.

アメリカ合衆国 46130 インディアナ州
ファウンテインタウン, フーリー ロー
ド 1261 ダブリュ.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.